



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2010

Messung von zytosolischem Ca²⁺ als Indikator toxischer Zellschädigung

Blenn, C ; Wyrsh, P ; Althaus, F R

Abstract: Oxidativer Stress ist toxisch und reduziert dosisabhängig den Anteil vitaler Zellen. Der erhöhte zytosolische Spiegel freier Ca²⁺-Ionen ist ein unmittelbarer Parameter nach der Applikation des ROS-Agens H₂O₂. Der Anstieg des zytosolischen Ca²⁺-Spiegels aus internen sowie auch aus externen Ca²⁺-Quellen kann mittels fluoreszenzspektrometrischer Analyse des Kalzium-bindenden Farbstoffs Fluo-4, AM bestimmt werden.

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich
ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-35852>
Journal Article

Originally published at:

Blenn, C; Wyrsh, P; Althaus, F R (2010). Messung von zytosolischem Ca²⁺ als Indikator toxischer Zellschädigung. BIOSpektrum, 16:438-440.

Oxidativer Stress

Messung von zytosolischem Ca^{2+} als Indikator toxischer Zellschädigung

CHRISTIAN BLENN, PHILIPPE WYRSCH, FELIX R. ALTHAUS
INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE, VETSUISSE-FAKULTÄT,
UNIVERSITÄT ZÜRICH, SCHWEIZ

In oxidativ gestressten Zellen kann die unmittelbare Steigerung der intrazytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (aus intra- bzw extrazellulären Kompartimenten) mittels Fluoreszenzspektrometrie visualisiert werden.

The Ca^{2+} indicator dye **Fluo-4 AM** allows the determination of cytosolic Ca^{2+} shifts from intra- and extracellular sources after a cytotoxic application of the oxidative stress mimic compound H_2O_2 .

Hintergrund

■ Zelluläre Systeme reagieren auf verschiedenen hierarchischen Ebenen bei einem toxischen Angriff. Je nach Art und Dosis des Agens antwortet die Zelle mit einer möglichen Reparatur der Schädigung, mit Seneszenz oder dem Tod.

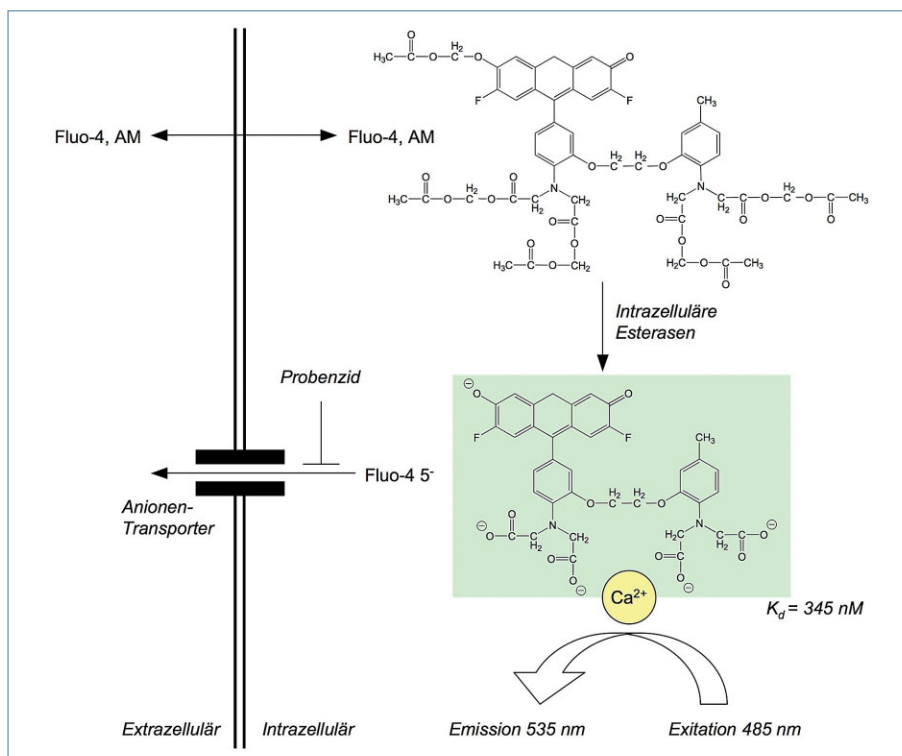
Freie Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) spielen eine zunehmende Rolle im Verständnis komplexer pathophysiologischer Prozesse, welche ausgehend von einzelnen Zellen eine profunde Gewebeerstörung zur Folge haben können. Störungen der Redoxbalance sowie das kurzzeitige massive Auftreten

von ROS gelten als primäre Ursache von akuten pathologischen Gefäßveränderungen (z. B. Hirnschlag, Ischämie/Reperfusion). Daneben sind ROS maßgeblich an Alterungsprozessen beteiligt. Freie Sauerstoffradikale sind höchst reaktiv und führen zur Oxidation von Proteinstrukturen, Lipidperoxidation und zu diversen oxidativen Schädigungen von Nukleotiden bis hin zu DNS-Strangbrüchen. All diese Veränderungen werden unter dem Schlagwort „oxidativer Stress“ zusammengefasst.

Physiologisch entstehen freie Sauerstoffradikale unter anderem als Beiprodukt der Zellatmung in den Mitochondrien, aus denen sie entweichen können. Hauptquellen stellen hier insbesondere Monoaminoxidasen und die Komplexe I und III der Atmungskette dar. Auch durch die Monooxygenase-Reaktionen der Cytochrom-P450-Enzyme im endoplasmatischen Reticulum können während der ersten Phase im Fremdstoffmetabolismus beträchtliche Mengen an ROS entstehen. Daneben sind freie Sauerstoffradikale aber auch ein etablierter Abwehrmechanismus gegen bakterielle und viroge Infektionen sowie Entzündungsreaktionen.

Um die oben genannten chemischen Modifikationen zu unterbinden, besitzt die Zelle ein Arsenal von enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien, welche freie Sauerstoffradikale unschädlich machen können. Diverse Metallion-abhängige Superoxiddismutasen (SOD) sind direkt vor Ort lokalisiert und können je nach Bedürfnis mittels gesteigerter Genexpression reguliert werden. Die oxidierte Form des Enzyms reagiert mit einem Superoxidion (O_2^-) unter Bildung von Sauerstoff und der reduzierten Form des Enzyms. Diese Form reagiert weiter mit einem zweiten Superoxidion und zwei Protonen. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und die oxidierte Form des Enzyms. Die allgemeine Reaktion lässt sich durch die Formel $2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ veranschaulichen. Als primäres nicht enzymatisches Antioxidans ist hier das Pseudotripeptid Glutathion (GSH) zu nennen.

Im Zellkulturmodell dient häufig Wasserstoffperoxid als gut etabliertes Agens für die



▲ Abb. 1: Schematische Darstellung der fluorezenzspektroskopischen Bestimmung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels mittels Fluo-4. Der Farbstoff **Fluo-4 AM** wird extrazellulär appliziert und diffundiert in die Zelle. Dort wird er durch Esterasen zur Kalzium-bindenden Form Fluo-4 5' metabolisch aktiviert. Probenzid verhindert das Ausströmen von Fluo-4 5' aus dem Zytosol.

Untersuchung der Physiologie und Pathophysiologie von oxidativem Stress. Im Folgenden wird der Anstieg zytosolischer Ca^{2+} -Gehalte als direkte Folge einer oxidativen Schädigung in embryonalen Mäusefibroblasten (MEFs) erläutert.

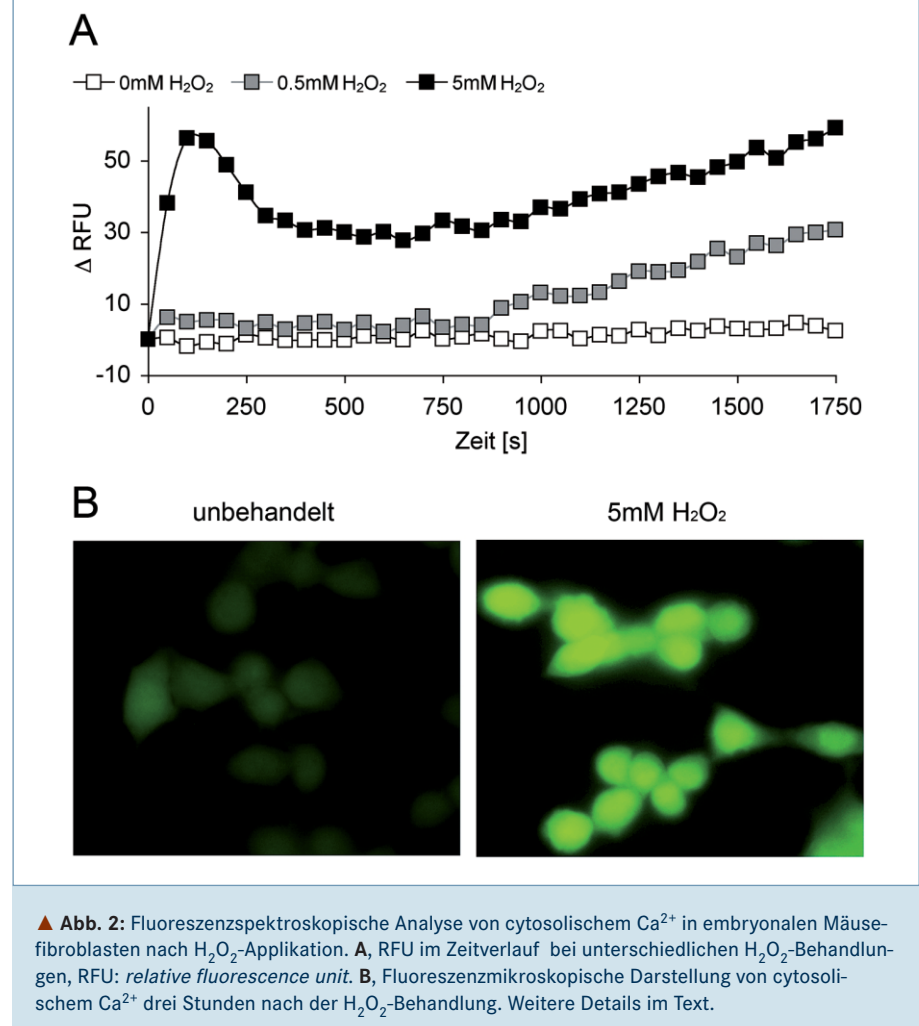
Zytosolischer Ca^{2+} -Spiegel als Viabilitätsparameter

In ungeschädigten Zellen unterliegt die Konzentration von Kalziumionen (Ca^{2+}) einem starken Gradienten an der Zellmembran. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ist mit ca. 100 nM etwa 10.000fach niedriger als die im extrazellulären Raum (ca. 1 mM). Dieses Gefälle wird durch mannigfaltige Ionentransporter in der Zellmembran stabilisiert und bleibt unter physiologischen Bedingungen stets konstant. Neben der Zellmembranbarriere gibt es auch innerhalb der Zelle Organellen, welche als Puffer und Speicher von freien Ca^{2+} -Ionen fungieren können. An erster Stelle ist hier das endoplasmatische Retikulum zu nennen, welches ein Vielfaches des zytosolischen Ca^{2+} -Gehalts beherbergen kann (ca. 500 μM). Aber auch Mitochondrien sind ein dynamischer intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und können schnell und effektiv freies Ca^{2+} aufnehmen. Daneben können Kalziumbindende Proteine, z. B. Calmodulin, überschüssiges Ca^{2+} abfangen und so helfen, die intrazelluläre Kalziumhomeostase aufrechtzuerhalten.

Ein Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} stellt für die Zelle ein bedrohliches Ereignis dar und führt, falls er nicht abgepuffert und eliminiert wird, zu einer unumkehrbaren Schädigung bis hin zum Zelltod. Freie und an Proteine gebundene Ca^{2+} -Ionen starten intrazelluläre Signalkaskaden, z. B. die Aktivierung von Kalzium-abhängigen Zelltodproteasen (Calpaine), und vermitteln so als *second messenger* die auftretende Zytotoxizität.

Die Messung von zytosolischen Ca^{2+} -Ionen nach oxidativem Stress in MEFs

Unter Laborbedingungen kann der zytosolische Anstieg freier Ca^{2+} -Ionen z. B. durch den Kalzium-bindenden fluoreszierenden Farbstoff Fluo-4 AM analysiert werden (Abb. 1). In Suspension wachsende oder kohärent kultivierte Zellen werden mit dem zellpermeablen Farbstoff geladen, welcher nach metabolischer Aktivierung durch intrazelluläre Esterasen in die Kalzium-bindende Form Fluo-4 5' überführt wird. Diese aktivierten Moleküle binden freies Ca^{2+} mit einer Dissoziationskon-



▲ **Abb. 2:** Fluoreszenzspektroskopische Analyse von cytosolischem Ca^{2+} in embryonalen Mäusefibroblasten nach H_2O_2 -Applikation. **A**, RFU im Zeitverlauf bei unterschiedlichen H_2O_2 -Behandlungen, RFU: relative fluorescence unit. **B**, Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von cytosolischem Ca^{2+} drei Stunden nach der H_2O_2 -Behandlung. Weitere Details im Text.

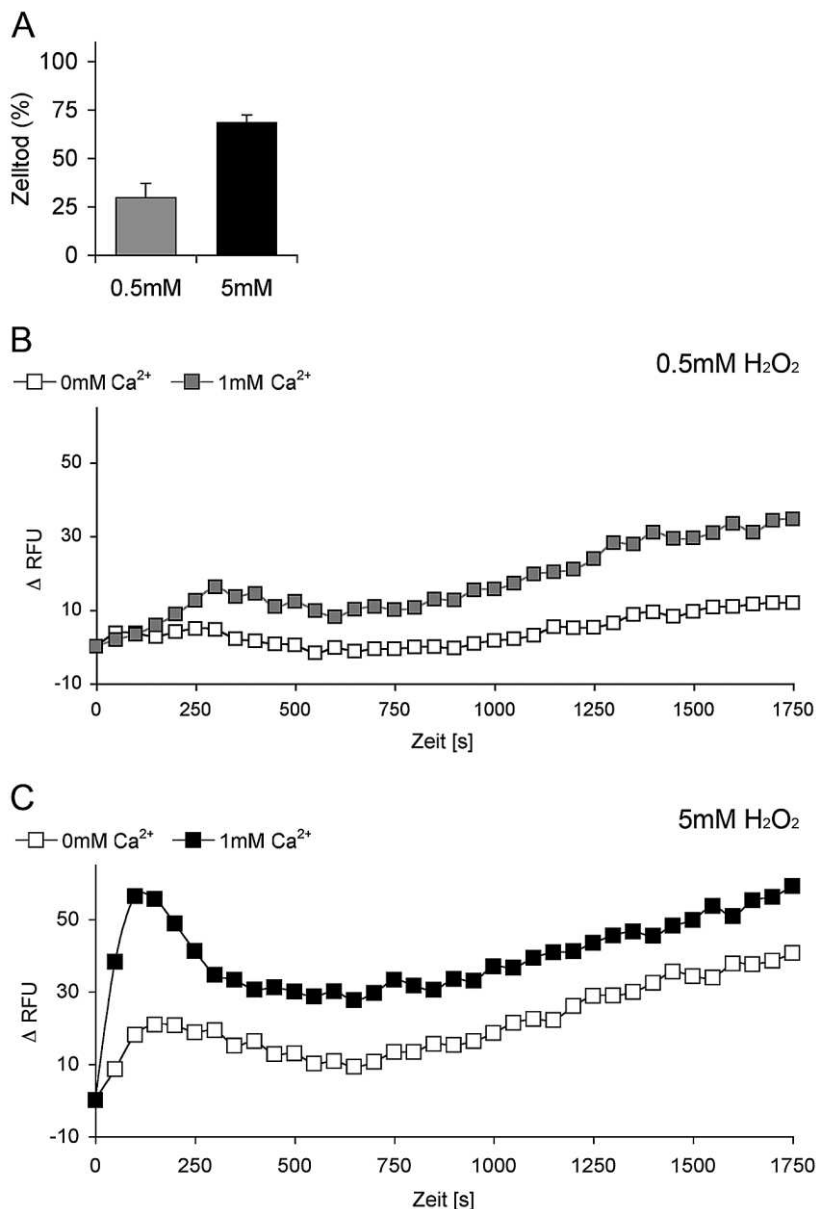
stanten von 345 nM [1]. Das so gebundene Ca^{2+} kann fluoreszenzspektroskopisch dargestellt werden. Die Anregungswellenlänge beträgt 485 nm. Gemessen wird bei einer Emissionswellenlänge von 535 nm. Der parallele Einsatz des Anionentransporterblockers Probenzid verhindert ein Ausströmen der aktivierten Fluo-4 5'-Moleküle aus der Zelle.

Der zytosolische Anstieg von Ca^{2+} -Ionen erfolgt unmittelbar nach der Applikation von H_2O_2 (Abb. 2A). In unbehandelten Zellen bleibt das Signal von Kalzium-aktiviertem Fluo-4 5' während der gesamten Messdauer von 30 Minuten konstant. Werden die Zellen jedoch mit H_2O_2 stimuliert, so steigt der RFU-Wert (relative fluorescence units) abhängig von der Dosis an. Durch eine Behandlung mit 5 mM H_2O_2 wird bereits nach 150 Sekunden ein erstes Maximum erreicht, welches im Anschluss partiell abgepuffert wird (bis ca. 650 Sekunden). Danach erfolgt ein zweiter Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels, der bis zum Ende der Messung anhält. Die geringere Dosis H_2O_2 (0,5 mM) folgt einer abgeschwächten Kinetik und zeigt kein erstes Maximum bei 150 Sekunden. Die Fluoreszenz des Farbstoffs Fluo-4 5' erlaubt zusätzlich eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zel-

len (Abb. 2B). Drei Stunden nach der H_2O_2 -Behandlung ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine deutliche Grünfärbung der murinen Fibroblasten zu verzeichnen. Diese Grünfärbung ist ein Indikator des cytosolischen Kalziums, das an Fluo-4 5' gebunden ist.

Der Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels korreliert mit der Zytotoxizität von H_2O_2

Massive Konzentrationen von ROS können zum Absterben der Zelle führen. Wir haben die Zytotoxizität von H_2O_2 in MEFs mittels dem metabolischen Zytotoxizitätstest AlamarBlue® bestimmt (Abb. 3A). In diesen Experimenten werden die Zellen für vier Stunden mit dem blauen Resazurin inkubiert und der Anteil des entstehenden pinkfarbenen Metaboliten und Viabilitätsindikators Resorufin mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Eine Applikation von 0,5 mM H_2O_2 initiiert nach 24 Stunden ca. 25 Prozent Zelltod. Die zehnfach höhere Dosis von 5 mM H_2O_2 reduziert die Anzahl vitaler Zellen um ca. 75 Prozent. Dieser Test bestätigt die Tatsache, dass eine gestörte intrazelluläre Kalziumhomeostase als Initiator des Zelltods zu



▲ **Abb. 3:** Durch den Entzug von extrazellulärem Ca²⁺ im Puffer kann mit dem Fluo-4-5'-Farbstoff der Anteil des Kalziums bestimmt werden, der aus intrazellulären Speichern stammt. **A**, Bestimmung der Zytotoxizität von H₂O₂ in embryonalen Mäusefibroblasten (MEFs) 20 Stunden nach der Behandlung mit dem metabolischen Zytotoxizitätstest AlamarBlue. Die Zellen wurden für vier Stunden mit dem blauen Resazurin inkubiert und der Anteil des entstehenden pinkfarbenen Metaboliten und Viabilitätsindicators Resorufin mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. **B**, Änderungen des zytosolischen Ca²⁺ nach einer subletalen H₂O₂-Dosis (0,5 mM) in MEFs in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ mittels Fluo-4-Assay. **C**, Analyse von Kalziumströmen nach einer letalen H₂O₂-Dosis (5 mM) in An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem Ca²⁺ mittels Fluo-4-Assay.

verstehen ist. Der sofortige und dosisabhängige Anstieg des zytosolischen Ca²⁺-Gehalts nach H₂O₂-Behandlung spiegelt die Ergebnisse von Resorufin wider.

ROS mobilisieren interne und externe Ca²⁺-Quellen

Wie bereits beschrieben, gibt es diverse Ca²⁺-Quellen, die nach einer Toxingabe zu einem Anstieg des cytoplasmatischen Ca²⁺-Spiegels führen können. Durch den Entzug von extrazellulärem Ca²⁺ im Puffer kann

mit dem Fluo-4-5'-Farbstoff der Anteil des Kalziums bestimmt werden, der aus intrazellulären Speichern stammt. Wir bestimmten diesen Anteil in MEFs, welche mit einer subletalen (0,5 mM) respektive einer letalen (5 mM) Dosis H₂O₂ behandelt wurden (Abb. 3B, C). Bei der H₂O₂-Konzentration von 0,5 mM werden fast ausschließlich Ca²⁺-Ströme aus dem extrazellulären Raum beobachtet. Die höhere Dosis von 5 mM H₂O₂ evokiert Ca²⁺-Ströme aus intra- und extrazellulären Quellen.

Zusammenfassung

Oxidativer Stress ist toxisch und reduziert dosisabhängig den Anteil vitaler Zellen. Der erhöhte zytosolische Spiegel freier Ca²⁺-Ionen ist ein unmittelbarer Parameter nach der Applikation des ROS-Agens H₂O₂. Der Anstieg des zytosolischen Ca²⁺-Spiegels aus internen sowie auch aus externen Ca²⁺-Quellen kann mittels fluoreszenzspektrometrischer Analyse des Kalzium-bindenden Farbstoffs Fluo-4 AM bestimmt werden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds sowie der Lotte und Adolf Hotz-Sprenger Stiftung Zürich finanziell unterstützt.

Literatur

[1] Hansen KB, Brauner-Osborne H (2009) FLIPR assay of intracellular calcium in GPCR drug discovery. *Methods Mol Biol* 552:269–278

Korrespondenzadresse:

Christian Blenn
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Vetsuisse-Fakultät
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich
Tel.: +41-(0)44-6358770
christian.blenn@vetpharm.uzh.ch

AUTOREN



Christian Blenn

Bis 2003 Agrarbiologiestudium in Stuttgart Hohenheim. Seit 2009 EUROTOX-registrierter Toxikologe.



Philippe Wyrch

Biologiestudium an der ETH Zürich. Seit 2008 PhD-Student am Institut für Pharmakologie und Toxikologie.



Felix R. Althaus

Leitung der Arbeitsgruppe „Poly(ADP-ribosyl)ierung“, die sich mit PARP/PARG-abhängigen Signalkaskaden in verschiedenen Zelltodmodellen beschäftigt.